ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Н.А. Одинцова, А.В. Борода, Н.М. Санина, Э.Я. Костецкий
Институт биологии моря Дальневосточного отделения РАН,
Дальневосточный государственный университет

СОЗДАНИЕ КРИОБАНКА КЛЕТОК И ЛИЧИНОК МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Для сохранения генофонда промысловых, редких и исчезающих видов морских беспозвоночных, для изучения их репродуктивной биологии без сезонных и географических ограничений необходимо создание современного криобанка половых продуктов, эмбрионов, личинок и клеток этих животных. Если замораживание спермиев является рутинной процедурой для многих видов, то замораживание ооцитов и эмбрионов на сегодняшний день остается проблематичным (Tervit et al., 2005). Обычные криопротекторы, используемые при замораживании клеток млекопитающих, являются неэффективными для данных объектов. Возможно, это связано с тем, что морские беспозвоночные являются пойкилотермными животными, а их тепловая акклимация происходит в достаточно широком диапазоне температур. Липидный состав их клеток регулируется таким образом, что мембраны могут поддерживать свою жидкокристаллическую структуру в оптимальном состоянии для функционирования при различных температурах морской воды, однако морские беспозвоночные не способны быстро приспосабливать вязкость липидного матрикса мембран к резким изменениям температуры (Sanina, Kostetsky, 2002). Особый жирнокислотный состав клеточных мембран морских животных и растений, в которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты (Sanina et al., 2004), требует принципиально новых криопротекторов.

Одним из основных факторов, ответственных за повреждение клеток при холодовом шоке, является нарушение целостности клеточных мембран и последующая генерация свободных радикалов (Hays et al., 1993). Ранее нами было показано, что липидные экстракты некоторых морских гидробионтов с низкими температурами фазовых переходов обладают эффективными криопротекторными свойствами (Odintsova et al., 2001, Odintsova et al., 2006). Возможно, это связано с тем, что жидкокристаллические липиды (в том числе, и экзогенные липиды) способны восстанавливать области разрушения или препятствовать повреждению мембраны во время замораживания-оттаивания (Watson, 1981). Введение в криопротекторную смесь липидных экстрактов из мидии *Mytilus trossulus* или зеленой водоросли *Ulva fenestrata,* сахара трегалозы (известного мембранного стабилизатора) и биоантиоксидантов значительно увеличило жизнеспособность клеток морских беспозвоночных и их функциональную активность. Известны работы, в которых для предотвращения окислительного стресса при замораживании эмбрионов и личинок в криопротекторные смеси вводили антиоксиданты: аскорбат - при замораживании мышиных эмбрионов (Lane et al., 2002), эхинохром – нафтахиноидный пигмент из морских ежей при замораживании личинок устрицы и морских ежей (Naidenko, 1997). Однако, хотя авторами и отмечен некоторый положительный эффект при введении антиоксидантов, только качественная оценка жизнеспособности, подвижности и развития личинок при отсутствии количественных данных о доле выживших личинок после замораживания-оттаивания не позволяет объективно оценивать результаты. Использование в наших экспериментах модельной системы клеток, а не целых эмбрионов и личинок, позволяет быстро (в течение суток) и ко-

Таблица 1

Жизнеспособность эмбриональных клеток мидии Mytilus trossulus и морского ежа Strongylocentrotus intermedius после замораживания-оттаивания

Объект	Живые клетки (%)	Мертвые клетки (%)	Разрушенные клетки (%)
M. trossulus Клетки трохофоры			
Без криопротекторов	2,6±0,6	4,2±0,2	93,2±2,8
ДМСО (10%)	5,0±0,4*	34,5±1,7	60,5±1,8
ДМСО (10%) + трегалоза (15 мг/мл)	5,0±0,4*	33,5±1,7	61,5±1,9
ДМСО + трегалоза + α-токоферол	5,3±0,5*	32,5±1,9	62,2±1,8
ДМСО + трегалоза + липидный экстракт ульвы (УЛЭ)	6,7±0,34**	32,5±1,08	60,8±2,2
ДМСО + трегалоза + липидный экстракт мидии (МЛЭ)	15,1±0,38**	24,1±1,02	60,8±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол	19,8±0,4**	24,1±1,02	56,1±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + эхинохром	15,1±0,38**	24,1±1,02	60,8±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол + эхинохром	19,8±0,4**	24,1±1,02	56,1±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол + аскорбиновая к-та	37,8±0,45**	24,1±1,02	42,1±2,2
S. intermedius Клетки гаструлы			
Без криопротекторов	12,0±1,0	20,5±1,87	67,5,0±2,7
ДМСО (10%) + трегалоза (15 мг/мл)	18,7±1,46*	26,6±1,83	54,7,0±2,3
ДМСО + трегалоза + эхинохром	18,2±2,5*	25,6±1,83	56,2±2,3
ДМСО + трегалоза + УЛЭ	26,5±1,66**	26,6±1,83	46,9,0±2,5
ДМСО + трегалоза + МЛЭ	31,3±1,46**	24,6±1,83	44,2,0±2,4
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол	31,3±1,46**	24,6±1,83	44,2,0±2,4
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + эхинохром	37,6±0,95**	18,2±1,02	44,2±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол + эхинохром	37,6±0,95**	18,2±1,02	44,2±2,2
ДМСО + трегалоза + МЛЭ + α-токоферол + аскорбиновая к-та	31,3±2,6*	24,6±1,8	44,2,0±2,4

Размороженные клетки культивировали 24 часа при 17° С.
Жизнеспособность незамороженных клеток исходных первичных культур была 93–99%. *p<0.05; **p<0.01 по сравнению с контролем без криопротекторов

личественно оценить эффект различных криопротекторов на целостность и функциональную активность клеток по уровню синтеза РНК. В Таблице 1 представлены результаты определения жизнеспособности клеток после замораживания-оттаивания в присутствии различных криопротекторов.

Наши данные показали, что использование в качестве дополнительного криопротектора общего липидного экстракта из тканей гидробионтов, содержащих большое количество липидов с ненасыщенными жирными кислотами, существенно увеличивало выход жизнеспособных клеток как мидии, так и морских ежей после оттаивания. Антиоксиданты (α-токоферол, аскорбиновая кислота и эхинохром) были эффективны только при использовании их вместе с липидными экстрактами. В присутствии липидных экстрактов антиоксиданты показали ярко-выраженную специфичность: для эмбриональных клеток морского ежа самым эффективным оказался эхинохром, а для клеток мидии - комплекс α-токоферола с аскорбиновой кислотой.

Применение в качестве криопротекторов комбинации трех важнейших компонентов, таких как мембранные стабилизаторы, экзогенные липиды и антиоксиданты, позволило значительно снизить потери биологической активности клеток мор-

ских беспозвоночных после размораживания за счет синергизма их действия.

Эта работа была выполнена за счет частичной поддержки Российского фонда фундаментальных исследований (06-04-96039) и Президиума ДВО РАН (06-III-A-06-166).

ABSTRACT

Development of cryopreservation methods permits to remove of seasonal and geographic limitations in investigations on sea animals, helps to establish cryobanks of rare and disappearing species. This work deals with analysis of known cryoprotectors and the search for new substances with potential cryoprotective properties for marine invertebrates. We studied a combined effect of the cryoprotectants both of carbohydrate and lipid origin at the presence DMSO on cell viability and the RNA synthesis of frozen-thaw embryonic mollusc and echinoderm cells. Cryoprotective properties of exogenous lipids correlated with their thermotropic behavior and depended of both membrane stabilizers and bioantioxidants. These methods would be a useful tool in cell technology of marine bioactive materials.

Литература

1. Hays LM, Feeney RE, Crowe LM, Crowe JH. Interaction of antifreeze glycoproteins with liposomes. Biophys. J. 1993. 64: 8296.
2. Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. 2002. Human Reproduction 17 (10): 2686-2693.
3. Naidenko TKh. Cryopreservation of Crassostrea gigas oocytes, embryos and larvae using antioxidant echinochrome A and antifreeze protein AFP1. 1997. Cryo-Letters 18: 375-382.
4. Odintsova NA, Kiselev KV, Sanina NM, Kostetsky EY. Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. 2001. Cryo-Letters 22: 299-310.
5. Odintsova NA, Ageenko NV, Kiselev KV, Sanina NM, Kostetsky EY. Analysis of marine hydrobiont lipid extracts as possible cryoprotective agents. Int. J. Refrigeration, 2006. 29: 387–395.
6. Sanina NM, Kostetsky EY. Thermotropic behavior of major phospholipids from marine invertebrates: changes with warm acclimation and seasonal acclimatization. Comp. Biochem. Physiol. 2002. 133B: 143–153.
7. Sanina NM, Goncharova SN, Kostetsky EY. Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes. 2004. Phytochemistry 65: 721–730.
8. Tervit HR, Adams SL, Roberts RD, McGowan LT, Pugh PA, Smith JF, Janke AR. Successful cryopreservation of Pacific oyster (Crassostrea gigas) oocytes. Cryobiology. 2005. 51(2): 142-51.

М.А. Егоров

Астраханский государственный университет (АГУ), Россия

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КАСПИЙСКОГО КРИОБАНКА

АННОТАЦИЯ

Астраханский государственный университет в рамках лаборатории биотехнологий ведет работу исследования, нацеленную на сохранение генома редких и исчезающих видов животных и растений Волго-Каспийского бассейна. Главная цель проекта - создание и реализация эффективной работы международного Каспийского криобанка фактическое восстановление биологического биоресурсов Каспийского бассейна, что будет способствовать реальному научно-практическому вкладу в развитие отраслей хозяйства прикаспийских государств. Исследования ведутся при поддержке Гранта Президента Российской Федерации и программы СТАРТ 06.

ANNOTATION

Astrakhan State University within the limits of the laboratory of biotechnologies is involved in research work aimed at preservation of the gene pool of rare and threatened species of fish (sturgeon and salmon), plants and animals of the Volgo-Caspian basin. The main purpose of the project is the creation and realization of effective work of the international Caspian cryobank, actual recovery of biological resourses of the Caspian region in all genetic and species diversity, which will make a significant scientific, practical and economical contribution into the development of the industries of the Caspian Sea countries. The research work is sponsored by the grant of the President of the Russian Federation aimed to support young Russian scientists and the leading scientific schools of the Russian Federation and of the program START 06.

Генотипический принцип в качестве самостоятельного способа предполагает обеспечение длительного хранения генотипов – создание генетических банков редких и исчезающих видов. Это особенно необходимо там, где исчерпаны резервы сохранения естественных популяций вида, а также там, где неконтролируемая интродукция и гибридизация ведут к утрате чистых природных популяций, к утрате генофонда [1-5].

Лаборатория биотехнологий Астраханского государственного университета ведет научно-исследовательскую работу по сохранению генофонда редких и исчезающих биообъектов Волго-Каспийского бас-